



Relatório Final do Programa de Ensaio de Proficiência
Avermectinas – Leite em Pó
Rodada 1 – Outubro- 2014

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO

Instituto Adolfo Lutz

Centro de Contaminantes

Núcleo de Contaminantes Orgânicos

Centro de Materiais de Referência

COORDENADORES DO PROGRAMA

Coordenador Técnico: Adriana Palma de Almeida

Coordenador Técnico Substituto: Luzia Shundo

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, 355 – Cerqueira César – Prédio da Química – 4º andar

São Paulo – SP – CEP: 01246-902

Tel: (11) 3068-2921/2922

E-mail: provedorave@ial.sp.gov.br

EQUIPE TÉCNICA

Janete Alaburda – – Diretora Técnica II – IAL (Centro de Contaminantes)

Leda Conceição Antonia Lamardo – Pesquisadora Científica – IAL (Centro de Contaminantes)

Simone Alves da Silva – Pesquisadora Científica – IAL (Centro de Contaminantes)

Valter Ruvieri – Pesquisador Científico – IAL (Centro de Contaminantes)

Elenice Lopes de Oliveira – Auxiliar Técnica – IAL (Centro de Contaminantes)

Sueli A. S. Cruz – Oficial de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica (Centro de Contaminantes)

APOIO



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	4
3. ESCOPO	4
4. SERVIÇOS SUBCONTRATADOS	4
5. PARTICIPAÇÃO	4
6. CONFIDENCIALIDADE	5
7. ITENS DE ENSAIO	5
8. TESTES DE HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE	6
9. ANÁLISE DOS RESULTADOS E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS LABORATÓRIOS	7
10. ATENDIMENTO AO PARTICIPANTE, RECLAMAÇÕES E CONTESTAÇÕES	9
11. USO DOS RESULTADOS PELAS PARTES INTERESSADAS	9
12. INFORMAÇÕES ADICIONAIS	9
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
ANEXO A - Relação dos laboratórios participantes	11
ANEXO B - Informações dos laboratórios sobre métodos analíticos utilizados	12

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento de grande valor nutritivo devido ao seu teor de proteínas, lactose, vitaminas e minerais, sendo essencial para os recém-nascidos, e importante para crianças e adultos. Segundo dados da EMBRAPA, o Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, com uma produção anual de leite superior a 19 milhões de litros.

A qualidade e inocuidade do leite representam importante tema de saúde pública. A presença de contaminantes no produto constitui um problema econômico e de saúde. Dentre os contaminantes presentes no leite, as avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) constituem um importante grupo de compostos que podem apresentar toxicidade.

As avermectinas são substâncias com atividades anti-helmíntica, inseticida e acaricida utilizadas rotineiramente na medicina veterinária com a finalidade de prevenir e controlar parasitas (nematóides e artrópodes). As avermectinas são altamente lipofílicas possuindo grande afinidade por gorduras corpóreas e apresentando prolongada persistência de concentração no organismo. Este fato resulta em uma lenta liberação da droga pelo organismo e consequente contaminação dos alimentos de origem animal, incluindo o leite (cerca de 5% da dose aplicada) sendo seu uso proibido em fêmeas em lactação, cujo produto seja destinado ao consumo humano. Os sintomas de intoxicação nos seres humanos incluem estados alterados da mente, hipotensão e falência respiratória.

No Brasil, não existe legislação específica para avermectinas, desta forma, os limites máximos tolerados para amostras de leite são os estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*: abamectina (5 µg/kg), doramectina (15 µg/kg) e ivermectina (10 µg/kg).

O Comitê do *Codex* que trata da segurança alimentar afirma que os níveis de contaminantes em alimentos deverão ser tão baixos quanto possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendem aos critérios de desempenho estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*.

Desta forma, há a necessidade da utilização de métodos seguros e confiáveis que garantam a qualidade analítica dos resultados. O uso regular de Materiais de Referência Certificados (MRC) e a participação em Programas Interlaboratoriais (PI) podem assegurar a qualidade dos resultados dos programas de monitoramento dos alimentos realizados pelos Laboratórios de Saúde Pública, bem como pelos laboratórios privados e universidades.

Atualmente, existem poucos provedores de ensaio de proficiência nacionais para análise de alimentos; isso dificulta a participação dos laboratórios atuantes nesta área em programas dessa natureza, e prejudica a avaliação de seu desempenho analítico.

O desenvolvimento e a operação de programas de ensaio de proficiência brasileiros diminuem a dependência a provedores internacionais, fornecendo aos laboratórios participantes evidências da confiabilidade de seus resultados e proporcionando oportunidades de melhorias.

2. OBJETIVOS

O Programa de Ensaio de Proficiência para a determinação de avermectinas em leite em pó (PEP AVE) tem como objetivos:

- ✓ Disponibilizar aos laboratórios participantes uma ferramenta para verificar sua competência na medição de avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) em leite em pó, utilizando as técnicas analíticas empregadas rotineiramente em seus laboratórios;
- ✓ Contribuir para a melhoria contínua dos procedimentos de medição de cada laboratório;
- ✓ Fornecer uma alternativa de participação de PEP em âmbito nacional e auxiliar no processo de avaliação para a acreditação de laboratórios junto à Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE/INMETRO).

3. ESCOPO

O provedor tem como escopo oferecer Programa de Ensaio de Proficiência para a determinação de avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) em leite em pó. A faixa de concentração das avermectinas nos itens de ensaio enviados aos participantes do Programa está entre 3 µg/kg e 30 µg/kg.

4. SERVIÇOS SUBCONTRATADOS

O PEP AVE não utilizou serviços subcontratados.

5. PARTICIPAÇÃO

O PEP AVE foi aberto à participação de laboratórios públicos, universidades públicas e privadas e laboratórios privados atuantes na área de toxicologia, que realizassem o ensaio de determinação de avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) em leite em pó. Os participantes utilizaram o método analítico de sua escolha, preferencialmente o método analítico de sua rotina.

6. CONFIDENCIALIDADE

O Provedor tratou com confidencialidade toda a informação, documentada ou não, recebida ou obtida durante a execução do PEP AVE.

Cada laboratório foi identificado por um código alfa-numérico individual, segundo a ordem de retorno dos formulários de inscrição ao provedor. O código de cada participante foi informado apenas ao responsável pela participação do laboratório no PEP.

O provedor do PEP AVE tem o compromisso de manter a confidencialidade de informações específicas dos laboratórios, incluindo identificação, resultados e desempenhos. Em circunstâncias excepcionais, por solicitação de autoridades regulamentadoras ou de acreditação, o provedor poderá fornecer os resultados diretamente a estas autoridades. Nestes casos, esta ação será notificada por escrito aos laboratórios envolvidos. O laboratório enviará um acordo também por escrito

7. ITENS DE ENSAIO

Foram adquiridas no comércio, amostras de leite em pó para o preparo dos itens de ensaio. As amostras foram produzidas a partir da adição dos padrões de abamectina, doramectina e ivermectina dissolvidos em solvente orgânico e adicionados ao leite em pó, de modo que os princípios ativos ficassem distribuídos homogeneamente em toda sua extensão, seguindo o método da diluição geométrica (Prista *et al.*, 1995).

Após o preparo, as amostras foram acondicionadas em embalagens aluminizadas devidamente identificadas com rótulo, contendo as seguintes informações: identificação do programa, item a ser ensaiado, código da amostra e rodada/ano em questão (Figura 1).

Para cada laboratório inscrito na 1ª Rodada do Ensaio de Proficiência para determinação de avermectinas em leite em pó, foi enviado 1 (um) item de ensaio contendo cerca de 8 g de leite em pó.

Foi produzido um lote de 80 unidades, que foi armazenado à temperatura ambiente em sala com controle de temperatura (20 - 25 °C).

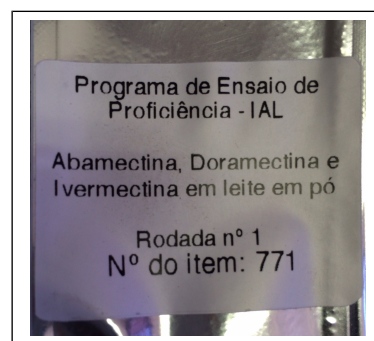


Figura 1: Item de ensaio do PEP AVE - detalhes da embalagem e do rótulo

8. TESTES DE HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE

Antes do envio das amostras aos laboratórios participantes, a coordenação do PEP AVE realizou testes para verificação da homogeneidade das amostras, de acordo com a norma ISO13528.

Além disso, a coordenação do PEP AVE efetuou testes de estabilidade, visando garantir a estabilidade das amostras até a conclusão da rodada.

8.1. Homogeneidade

O teste de homogeneidade entre amostras foi realizado de acordo com o descrito na ISO 13528, utilizando o desvio padrão de Horwitz/Thompson como desvio padrão para avaliação da proficiência.

Doze (12) amostras foram selecionadas e analisadas em duplicata, aleatoriamente. Em cada amostra foi determinada o teor de abamectina, doramectina e ivermectina pelo método CLAE com detecção por fluorescência.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk, com 95% de confiança, não sendo verificada a presença de valores discrepantes ou outliers, tendências, descontinuidade ou algum outro efeito sistemático, por meio dos testes de Grubbs.

Dessa forma, o material mostrou-se homogêneo para as avermectinas analisadas: abamectina, doramectina e ivermectina.

8.2. Estabilidade

Para avaliar a estabilidade das avermectinas em leite em pó durante o transporte, um estudo de estabilidade clássico de curta duração foi conduzido. Para isso, duas amostras foram selecionadas aleatoriamente e armazenadas à temperatura de 42 °C por 3, 5 e 7 dias. Após o período de armazenamento, as amostras foram analisadas em triplicata pelo método CLAE com detecção de fluorescência.

Foram consideradas as 24 análises feitas para avaliar a homogeneidade do material como o tempo zero (0) ou instante inicial, sendo que o material não foi submetido à temperatura de 42 °C. As medições foram realizadas aleatoriamente e em condições de repetibilidade.

Todos os resultados de abamectina, doramectina e ivermectina foram checados quanto à presença de valores discrepantes por meio dos testes de Grubbs*, com 95% de confiança, realizados no Excel 2010. Não foram detectados resultados discrepantes das análises efetuadas nos tempos 0, 3, 5 e 7 dias.

Por meio da visualização dos gráficos de resíduos, os dados mostraram-se provenientes de uma distribuição normal e homocedástica. De qualquer forma, verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk com 95% de confiança, obtida por meio do software Action, versão 2.4 de maio/2012.

Os itens de ensaio foram considerados suficientemente estáveis para a finalidade deste programa.

9. ANÁLISE DOS RESULTADOS E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS PARTICIPANTES

O PEP AVE contou com 11 laboratórios inscritos; no entanto, um laboratório não enviou os resultados por problemas técnicos, e outro foi desclassificado por não ter enviado os resultados na forma quantitativa. Por esta razão, não foi possível efetuar a avaliação de desempenho, uma vez que o número mínimo de 10 participantes com resultados válidos não foi atingido, conforme preconizado no protocolo do PEP.

9.1. Metodologia aplicada

Estatística descritiva e testes robustos. O EXCEL 2010 foi utilizado para determinação dos valores médios, desvios padrão e coeficiente de variação dos resultados válidos apresentados pelos participantes do PEP.

9.2. Resultados

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão os resumos estatísticos dos resultados válidos apresentados pelos participantes na determinação de avermectinas em leite em pó.

Tabela 1. Resultados de três medições para determinação de abamectina em leite em pó.

Código dos laboratórios	Medições (ug/kg)			Média	Desvio Padrão	CV (%)
	1	2	3			
AVE-01/21	19,2	20,3	19,3	19,60	0,61	3,1
AVE-01/33	16,43	15,87	14,65	15,65	0,91	5,8
AVE-01/46	12,10	10,33	11,65	11,36	0,92	8,1
AVE-01/48	10,62	10,31	10,33	10,42	0,17	1,7
AVE-01/49*	<25	<25	<25	-	-	-
AVE-01/66	12,02	11,59	12,17	11,93	0,30	2,5
AVE-01/68	5,90	5,15	5,41	5,49	0,38	6,9
AVE-01/72	8,6	8,6	9,3	8,83	0,40	4,6
AVE-01/87	12,58	13,15	13,22	12,98	0,35	2,7
AVE-01/89	7,917	7,997	6,690	7,53	0,73	9,7
AVE-01/97	-	-	-	-	-	-

* Resultado expresso na forma não quantitativa

Tabela 2. Resultados de três medições para determinação de doramectina em leite em pó.

Código dos laboratórios	Medições (ug/kg)			Média	Desvio Padrão	CV (%)
	1	2	3			
AVE-01/21	13,5	14,4	13,9	13,93	0,45	3,2
AVE-01/33	13,10	12,52	12,63	12,75	0,31	2,4
AVE-01/46	6,31	4,99	5,32	5,54	0,69	12,4
AVE-01/48	7,17	7,52	7,41	7,37	0,18	2,4
AVE-01/49*	<25	<25	<25	-	-	-
AVE-01/66	10,60	10,06	10,76	10,47	0,37	3,5
AVE-01/68*	<7,5	<7,5	<7,5	-	-	-
AVE-01/72	10	10	11	10,33	0,58	5,6
AVE-01/87	7,69	7,29	6,94	7,31	0,38	5,1
AVE-01/89	8,740	9,316	10,392	9,48	0,84	8,8
AVE-01/97	-	-	-	-	-	-

* Resultado expresso na forma não quantitativa

Tabela 3. Resultados de três medições para determinação de ivermectina em leite em pó.

Código dos laboratórios	Medições (ug/kg)			Média	Desvio Padrão	CV (%)
	1	2	3			
AVE-01/21	11,2	8,9	12,5	10,87	1,82	16,8
AVE-01/33	14,23	12,30	12,51	13,01	1,06	8,1
AVE-01/46	18,84	15,42	14,29	16,18	2,37	14,6
AVE-01/48	10,46	10,50	10,70	10,55	0,13	1,2
AVE-01/49*	<25	<25	<25	-	-	-
AVE-01/66	10,73	10,63	10,40	10,59	0,17	1,6
AVE-01/68	5,77	5,31	4,94	5,34	0,42	7,8
AVE-01/72**	0,65	0,64	0,70	0,66	0,03	4,8
AVE-01/87	19,46	19,03	16,45	18,31	1,63	8,9
AVE-01/89	10,434	8,968	11,039	10,15	1,06	10,5
AVE-01/97	-	-	-	-	-	-

* Resultado expresso na forma não quantitativa

** Resultado não válido estatisticamente

Na tabela 4 são apresentadas as estatísticas descritivas.

Tabela 4. Estatística descritiva da determinação das avermectinas (ug/kg) em leite em pó.

	Abamectina	Doramectina	Ivermectina
Média robusta	11,35	9,65	11,88
Desvio robusto	4,42	3,23	4,52
Incerteza da média robusta	1,84	1,43	2,00

Na tabela 5 são apresentados os erros relativos à média robusta dos laboratórios participantes na determinação de avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) em leite em pó.

Tabela 5. Diferença percentual entre a média do laboratório e a média robusta.

Código dos laboratórios	Diferença Percentual (%)		
	Abamectina	Doramectina	Ivermectina
AVE-01/21	72,7	44,4	-8,5
AVE-01/33	37,9	32,1	9,5
AVE-01/46	0,1	-42,6	36,2
AVE-01/48	-8,2	-23,7	-11,2
AVE-01/66	5,1	8,5	-10,9
AVE-01/68	-51,7	-	-55,1
AVE-01/72	-22,2	7,1	-94,4
AVE-01/87	14,4	-24,3	54,2
AVE-01/89	-33,6	-1,7	-14,6

10. ATENDIMENTO AO PARTICIPANTE, RECLAMAÇÕES E CONTESTAÇÕES

O provedor encontra-se aberto aos participantes e outros interessados para esclarecimentos sobre o PEP AVE que se fizerem necessários.

O PEP AVE compromete-se a corrigir prontamente qualquer equívoco que possa ter cometido. Na ocorrência de dúvidas quanto a qualquer aspecto do Programa, o participante poderá entrar em contato com o coordenador do PEP AVE por meio de correio eletrônico, no endereço provedorave@ial.sp.gov.br. O Programa encontra-se igualmente atento a sugestões que lhe sejam enviadas, as quais serão registradas, analisadas e respondidas.

As apelações sobre a avaliação de desempenho ou reclamações, recebidas dos laboratórios participantes, clientes e outras partes, serão avaliadas e, quando pertinentes, incluídas no relatório ou comunicadas aos interessados.

Informações adicionais a respeito do ensaio de proficiência podem ser obtidas através do e-mail: provedorave@ial.sp.gov.br ou telefone +55 11 3068-2921.

11. USO DOS RESULTADOS PELAS PARTES INTERESSADAS

A coordenação se reserva no direito de apresentar os resultados deste PEP em publicações ou em eventos científicos respeitando-se a confidencialidade dos laboratórios.

12. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A coordenação do PEP AVE empenhou-se ao máximo no sentido de desestimular a colusão ou falsificação de resultados. A política para evitar tal situação é a adoção de práticas,

como a identificação dos itens de ensaio de forma aleatória e unívoca em relação à rodada e não divulgação prévia dos resultados.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17043. "Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais para Ensaio de Proficiência". Rio de Janeiro: ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food and Feed: Maximum Residues Limits for Abamectin. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/details.html;jsessionid=2E238A6E82160283E367BACC6DF803FF?d-16497-o=2&id=177&d-16497-s=3>

CODEX ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Residues in Food: Maximum Residues Limits for Doramectin. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html?id=26>

CODEX ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Residues in Food: Maximum Residues Limits for Ivermectin. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html?id=39>

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods. CAC/GL 16-1993. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010). EMBRAPA Gado de Leite. Available from: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. Acesso em: 09/09/2014.

ISO 13528. "Statistical Methods for use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons." Geneva: ISO - International Organization for Standardization, 2005.

PRISTA LN, ALVES AC, MORGADO R. Tecnologia Farmacêutica. vol 1. 5ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 1995, p. 260-261.

ANEXOS

Anexo A - Relação dos laboratórios participantes

AGROSAFETY MONITORAMENTO AGRÍCOLA LTDA (Piracicaba - SP)

BIOAGRI ANÁLISE DE ALIMENTOS LTDA - Laboratório de Multi-resíduos (São Paulo - SP)

LABTEC - LABORATÓRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA S/A - Laboratório de Resíduos e Contaminantes (Hortolândia - SP)

LACEN/GO – Laboratório Central de Saúde Pública Dr Giovanni Cysneiros – Laboratório de Toxicologia (Goiânia - GO)

LACEN/MG - Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais - FUNED – Fundação Ezequiel Dias - Divisão de Vigilância Sanitária / Serviço de Química / Laboratório de Microcomponentes (Belo Horizonte/MG)

LACEN/PR – Laboratório Central do Estado do Paraná - Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental - Seção de Resíduos e Contaminantes (Curitiba/PR)

MICROBIAL Laboratório de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas Ltda - Laboratório de Cromatografia (Campinas/SP)

NESTLE QUALITY ASSURANCE CENTER - Laboratório de Físico Química (São Paulo/SP)

TASQA SERVIÇOS ANALÍTICOS – Laboratório de Multi Resíduos (Paulínea - SP)

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – Faculdade de Saúde – Laboratório de Toxicologia (LABTOX)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM – Departamento de Química - Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas – LARP (Santa Maria/RS)

Anexo B - Informações sobre os métodos analíticos utilizados pelos laboratórios

Nº	Código do Laboratório	Método/Técnica	Referência	LQ (µg/kg)	Método Modificado	Método Validado	Ensaio Acreditado
1	AVE-01/21	UPLC-MS/MS	Método do próprio laboratório	1,5	Não	Não	Não
2	AVE-01/33	CLAE-FL	Journal of AOAC	1,0	Não	Sim	Não
3	AVE-01/46	QuEChERS, LC-MS/MS	Anastassiades, M et al. J.AOAC International, v.86, p.412-431, 2003	1,0	Sim	Sim	Não
4	AVE-01/48	SPE, LC-MS/MS	Método do próprio laboratório	5,0	Não	Sim	Não
5	AVE-01/49	LC-MS/MS	Método do próprio laboratório	25,0	Não	Sim	Sim
6	AVE-01/66	LC-MS/MS	PRO-MTD 5.04-0479	ABA 5,0 DORA 5,0 IVER 10,0	Sim	Sim	Sim
7	AVE-01/68	MR-PA 016 / LC-MS/MS	QuEChERS	ABA <2,5 DORA <30,0 IVER <5,0	Sim	Sim	Sim
8	AVE-01/72	CLAE-FL	Berendsen et al. Aalytica Chimica Acta, 585: 126-133, 2007	0,2	Não	Sim	Não
9	AVE-01/87	CLAE-FL	Análise de avermectinas em fígado e leite por CLAE-FL e confirmação por CLAE-EM	1,6	Sim	Sim	Não
10	AVE-01/89	DSPE, LC-MS/MS	Pesticide Residue Analysis in Whole Milk by QuEChERS	5,0	Não	Sim	Não
11	AVE-01/97	Laboratório não enviou os resultados por problemas técnicos					